

DIALOG(R)File 351:DERWENT WPI
(c)1998 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

007294643

WPI Acc No: 87-291650/198741

XRAM Acc No: C87-123872

Recombinant DNA prodn. of sugar nucleotide - by transforming host cells with portable vehicle contg. sequence expressing enzymes for product synthesis

Patent Assignee: BETLACH M R (BETL-I); GETTY SCI DEV CO (GETT-N)

Inventor: BETLACH M R; DOHERTY D H; VANDERSLICE R W; VANDERSLIC R W

Number of Countries: 003 Number of Patents: 007

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
WO 8705937	A	19871008	WO 87US605	A	19870324		198741 B
NO 8704879	A	19880222					198813
JP 1500560	W	19890301	JP 87502314	A	19870324		198915
EP 380470	A	19900808	EP 87902918	A	19870324		199032
EP 380470	B1	19950215	EP 87902918	A	19870324	C12P-019/02	199511
			WO 87US605	A	19870324		
DE 3751066	G	19950323	DE 3751066	A	19870324	C12P-019/02	199517
			EP 87902918	A	19870324		
			WO 87US605	A	19870324		
NO 179875	B	19960923	WO 87US605	A	19870324	C12N-015/00	199644
			NO 874879	A	19871123		

Priority Applications (No Type Date): US 86843349 A 19860324; US 8729091 A 19870323

Cited Patents: 4.Jnl.Ref; WO 8705938

Patent Details:

Patent	Kind	Lan	Pg	Filing Notes	Application	Patent
WO 8705937	A	E	45			
EP 380470	B1	E	39	Based on		WO 8705937
DE 3751066	G			Based on		EP 380470
				Based on		WO 8705937
NO 179875	B			Previous Publ.		NO 8704879

Abstract (Basic): WO 8705937 A

Recombinant DNA method for sugar nucleotide (I) prodn. comprises cloning at least one portable DNA sequence (A), able to direct an alternate host microorganism to produce (I), into a vector which can be transferred to, and replicated in, host microorganisms. These vectors contain elements for expression of enzymes coded for by (A). The vectors are used to transform suitable host microorganisms and the transformants cultured under conditions where the vectors will produce (I).

Also new are (1) plasmids able to direct expression of UDP-glucose pyrophosphorylase; UDP-glucose dehydrogenase; phosphoglucomutase; phosphomannose mutase and GDP-mannose pyrophosphorylase, specifically pA57, pA59 and pT513 and (2) the microorganisms *Xanthomonas campestris* X872 (ATCC 53471) and *E.coli* LE 392 transformed with the specified plasmids (ATCC 67050, 67048 and 67047, respectively).

USE/ADVANTAGE - The method is used to produce UDP-glucose, UDP-glucuronic acid and GDP-mannose, which are then incorporated into e.g. polysaccharides (esp. xanthan gum and modified forms), colonic acid (a potential synthetic antigen for use in vaccination) or antibiotics.

Title Terms: RECOMBINATION; DNA; PRODUCE; SUGAR; NUCLEOTIDE; TRANSFORM; HOST; CELL; PORTABLE; VEHICLE; CONTAIN; SEQUENCE; EXPRESS; ENZYME; PRODUCT; SYNTHESIS

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/00; C12P-019/02

International Patent Class (Additional): C12N-001/20; C12N-007/00;

C12N-015/63; C12P-019/12; C12P-019/30

File Segment: CPI

⑫ 公表特許公報(A)

平1-500560

⑬ 公表 平成1年(1989)3月1日

⑭ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

審査請求 未請求

予備審査請求 未請求

部門(区分) 1(1)

C 12 P 19/30
C 12 N 1/20
15/G07236-4B
G-8515-4B
A-8412-4B※

(全 20 頁)

⑮ 発明の名称 組換DNA法を用いる糖スクレオチドの合成方法

⑯ 特 願 昭62-502314

⑰ 出 願 昭62(1987)3月24日

⑱ 翻訳文提出日 昭62(1987)11月17日

⑲ 国際出 願 PCT/US87/00605

⑳ 国際公開番号 WO87/05937

㉑ 国際公開日 昭62(1987)10月8日

優先権主張 ㉒ 1986年3月24日㉓ 米国(US)㉔ 843,349

⑳ 発 明 者 ビトラッチ、マイケル、アー アメリカ合衆国、コロラド 80303、ボウルダー、ウエスト ムー
アヘッド サークル 4848㉑ 発 明 者 ドハーティ、ダニエル、エイ アメリカ合衆国、コロラド 80303、ボウルダー、イサカ ドライ
チ、 ブ 719㉒ 出 願 人 ゲティ サイエントイフイツク アメリカ合衆国、テキサス 77215-0070、ヒューストン、ブライ
デベロップメントカンパニー アーパーク 3901

㉓ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外4名

㉔ 指 定 国 AT(広域特許)、BE(広域特許)、CH(広域特許)、DE(広域特許)、DK、FI、FR(広域特許)、GB(広域
特許)、IT(広域特許)、JP、LU(広域特許)、NL(広域特許)、NO、SE(広域特許)、US、US

最終頁に続く

摘 求 の 範 囲

1. 糖スクレオチドの製造のための組換DNA法であって、
(a) 少なくとも1種類の糖スクレオチドを生産するよう
に代替宿主微生物を指示することができる少なくとも1つの
ポータブルDNA配列を用意し;

(b) 宿主微生物中に移行することができそしてその中で
複製することができるベクターであって、前記ポータブル
DNA配列によりコードされている生合成酵素の発現のため
の要素を含有するベクターの少なくとも1つに、該ポータブル
DNA配列をクロニングし;

(c) 前記ポータブルDNA配列を含有する前記ベクター
を、該ポータブルDNA配列の指令のもとで少なくとも1種
類の糖スクレオチドを生産することができる宿主微生物中に
移行せしめ;

(d) 前記ベクターの維持及び前記糖スクレオチドの合成
のために適当な条件下で前記宿主微生物を培養し;そして場
合によっては、

(e) 前記糖スクレオチドを採取する;
ことを含んで成る方法。

2. 製造されるべき前記糖スクレオチドがUDP-グルコ
ースである請求の範囲第1項に記載の方法。

3. 製造されるべき前記糖スクレオチドがUDP-グルク
ロン酸である請求の範囲第1項に記載の方法。

4. 製造されるべき前記糖スクレオチドがGDP-マンノ

ースである請求の範囲第1項に記載の方法。

5. 前記ベクターがpAS7、pAS9及びpTS13から成る群から
選択されたものである請求の範囲第1項に記載の方法。

6. 前記宿主が放線菌である請求の範囲第1項に記載の
方法。

7. 前記宿主がクロストリジウム(*Clostridium*)属の細菌
から選ばれたものである請求の範囲第1項に記載の方法。

8. 前記宿主がシュードモナス・ブチダ(*Pseudomonas*
butida)、シュードモナス・セバシア(*Pseudomonas*
sebasia)、シュードモナス・デニトリフィカンス(*Pseudomonas*
denitrificans)、シュードモナス・フルオレッセンス(*Pseudomonas*
fluorescens)、シュードモナス・ストップフェリ(*Pseudomonas*
stutzeri)、エッシャーリシャ・コリ(*Escherichia coli*)、
及びエンテロバクター・クロアカエ(*Enterobacter cloacae*)
から成る群から選ばれたものである、請求の範囲第1項に記
載の方法。

9. UDP-グルコース・ピロホスホリラーゼ、UDP-
グルコースデヒドロゲナーゼ、ホスホグルコミターゼ、ホス
ホマンノミターゼ及びGDP-マンノース・ピロホスホリラ
ーゼから成る群から選ばれた酵素の少なくとも1種を合成す
るよう微生物細胞を指示することができる少なくとも1種
類のプラスミドを含んで成る製造物。

10. プラスミドpAS7。

11. プラスミドpAS9。

12. プラスミドpTS13。

13. UDP-グルコース、UDP-グルクロン酸及びGDP-マンノースから成る群から選ばれた1又は複数の糖スクレオチドの微生物的合成を指令することができるプラスミド。

14. X.カンペストリス (*X. campestris*) X872株の微生物。

15. E. コリ (*E. coli*) LE392(pAS7)株の微生物。

16. E. コリ (*E. coli*) LE392(pAS9)株の微生物。

17. E. コリ (*E. coli*) LE392(pTS13)株の微生物。

組換えDNA法を用いる糖スクレオチドの合成方法

発明の背景

これは、1986年3月24日に出願された米国特許出願No. 843,349号の一部継続出願である。

この発明は種々の糖スクレオチドの製造のための組換えDNA法に関し、この糖成分は次に、やはり組換えDNA法により微生物的に生産されるポリサッカライドに導入される。

ある種の微生物が工業的に有用な種々のポリサッカライドを生産することができることは古くから知られている。ポリサッカライドの生合成に先立ち、これらの微生物はポリサッカライドを構成するための糖スクレオチド源を有さなければならない。キサントガンムを生産することができる微生物であるキサントモナス・カンペストリス (*Xanthomonas campestris*) の場合、糖スクレオチドであるUDP-グルコース、GDP-マンノース及びUDP-グルクロン酸が生合成経路における直接の前駆体のすべてであることが見出されている。すなわち、キサントガンムの生合成の経路を説明するにあたり、本発明者等はX.カンペストリス (*X. campestris*) における糖スクレオチドの合成を担当するDNA配列を見出し、そしてキサントモナス (*Xanthomonas*) sp. 及びこれに代る宿主においてこれらの糖スクレオチドを生産するための組換えDNA法を開発した。

キサントガンムを天然に生産することができるキサントモナス sp. において糖スクレオチドの生産を増加せしめるためのこれらの方法の開発は、これらの微生物によるこのポリサッカライドの生産の増加を可能にするはずである。これらの微生物中には検出することができるレベルの糖スクレオチド前駆体が存在するが、それらのレベルは低いことが見出された。さらに、ポリサッカライドの合成を担当する生合成経路の部分に変異が存在するキサントモナス生物体中では、これらの糖スクレオチド前駆体の細胞内量が2〜7倍増加することも注目された。従って、天然キサントガンム生産における律速段階は糖スクレオチド前駆体濃度であり、そして糖スクレオチド生産を指令することができる追加のDNA配列の導入により細胞内糖スクレオチド濃度を上昇せしめることができると信じられる。

さらに、キサントガンムの製造のための組換えDNA法において使用するための代替宿主として望ましいと認められる幾つかの微生物は一般に、必要とされる糖スクレオチド前駆体を生産しないか、又はキサントガンム生産を可能にするために効果的な量ではそれらを生産しないことが見出された。最近期待されているこの様な組換えDNA法及び代替宿主の例は、1986年3月26日に出願された、"Recombinant DNA-Mediated Production of Xanthan Gum"と題するMichael A. Capage等の米国特許出願No. 844,332号に記載されている。従って、これらの方法においては、キサントガンム生合成遺伝子を発現させるのに加えて、必要とされる糖スクレオチド前駆体を生産する

ように代替宿主を誘導する必要がある。本発明は一部においてこの様な方法を提供する。

さらに、本発明の方法は、キサントガン以外のポリサッカライドに糖を導入することが意図される場合に糖スクレオチド生産を誘導するために使用することができる。例えば、生合成前駆体として本発明の糖スクレオチドの幾つか又はすべてを必要とするキサントガンの変形体である他の種々のガムが同定されている。これらのガムには、1985年8月6日に出願された"A Polysaccharide Polymer Made by Xanthomonas"と題するVanderslice等の係属中の米国特許出願No. 762,878号に記載されている。

さらに、ここに開示する糖スクレオチドの製造のための組換えDNA法は、医薬製剤としても関心が持たれるある種のポリサッカライドの製造のためにも使用されることが期待される。例えば、E. コリ (*E. coli*) により生産されるポリサッカライドコロニック酸(colonic acid)は、予防接種目的に有用な可能性ある抗原として期待される。コロニック酸の生産は前駆体糖スクレオチドの増加した微生物的生産により開始され又は増強されると信じられる。

発現及び活性を調節する通常の制御機構は外来DNA又は酵素については有効でないから、他の微生物種へのDNA配列の導入はこれらの配列により指令される糖スクレオチドの生産を増強することでもできるであろう。さらに、多くの抗生物質例えばストレプトマイセス (*Streptomyces*) の種により生産されるマクロライド抗生物質の一般的部類は糖スクレオ

チド前駆体に由来する糖成分を有する。糖スクレオチドを製造するための組換DNA法をこのような微生物に適用して抗生物質の生合成のために必須の前駆体の利用を増強することができる。

発明の概要

この発明の1つの目的は、糖スクレオチドの組換DNA法による製造方法を提供することである。これらの糖スクレオチドは、種々のポリサッカライドのイン-ビボ合成において、特に、キサンタン及び1986年3月26日に出願された"Family of Xanthan-Based Polysaccharide Polymers Including Non-Acetylated and/or Non-Pyruvylated Gum and Acetylated or Non-Acetylated Polytetramer Gum"と題するDoherty等の米国特許出願No. 844,435中に十分に記載されている、キサンタンに構造的に関連する新規なポリサッカライドの合成において使用することができると期待される。

これらの糖スクレオチドの組換DNAによる合成を促進するため、本発明の他の目的はこれらのポータブル配列を含有するベクターを提供することである。これらのベクターを組換系において使用して、微生物的に生産されるポリサッカライドを生産せしめるのに十分な量の糖スクレオチドを生産することができる。

この発明の追加の目的及び利点は一部は明細書に記載され、又はこの発明の実施によって知られるであろう。これらの目的及び利点は添付された請求の範囲において具体的に指摘さ

れる手段及び組合わせにより実現され、そして達成されるであろう。

これらの目的を達成するため、そして本発明の目的に従って、糖スクレオチドの製造方法が記載される。この様な糖スクレオチドの糖成分は、1986年3月26日に出願された"Recombinant-DNA Mediated Production of Xanthan Gum"と題するCapage等の米国特許出願No. 844,332に記載されている方法及びベクターを用いて、キサンタンのごときポリサッカライドに導入されるであろう。

ポータブルDNA配列は合成配列でも制限断片("天然" DNA配列)でもよい。好ましい態様においては、ポータブルDNA配列はX.カンベストリスのライブラリーから単離され、そして代替宿主に移行される場合、少なくとも1種の糖スクレオチドの生産を指令することができる。

さらに、前記の目的を達成するため、そして本発明の目的に従って、前記のポータブルDNA配列を用いて、キサンタンガム及び他のポリサッカライドを製造するために使用することができる糖スクレオチドの微生物的生産をもたらす組換DNA法が開示される。この組換DNA法は:

- a) 少なくとも1種類の糖スクレオチドを生産するように代替宿主微生物を指令することができる少なくとも1のポータブルDNA配列を調製し;
- b) 宿主微生物に移行することができそしてその中で複製することができるベクターであって、生合成酵素をコードする前記ポータブルDNA配列の発現のための因子を含有する

ベクターに該ポータブルDNA配列をクローニングし;

c) 前記ポータブルDNA配列の指令のもとで糖スクレオチド合成のための生合成酵素を生産することができる宿主微生物へ、該ポータブルDNA配列を含有する前記ベクターを移行せしめ;

d) 前記ベクターの維持及び前記糖スクレオチドの合成のために適当な条件下での前記宿主微生物を培養し;そして場合によっては、

e) 前記糖スクレオチドを採取する;

を含んで成る。

前記の目的をさらに達成するため、そして本発明の目的に従って、前記のポータブルDNA配列の少なくとも1つをそれぞれが含有する一連のプラスミドが提供される。特に、プラスミドpAS7、pAS9及びpTS13が開示される。さらに、ホスホグルコムターゼを欠くX.カンベストリスの変異株X872が提供される。キサントモナス・カンベストリスX872株は、1986年3月21日に、American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Marylandに、受託番号No. 53471として寄託された。プラスミドpAS9を担持するE.コリLE392(pAS9)、プラスミドpAS7を担持するE.コリLE392(pAS7)、及びプラスミドpTS13を担持するE.コリLE392(pTS13)が、1986年3月21日に、それぞれNo.67050、No.67048、およびNo.67047として寄託された。

前記の一般的記載及び以後の詳細な記載にいずれも単に例示しそして説明するためのものであって、請求の範囲のよう

にこの発明を限定するものではないと理解すべきである。添付図面は、この明細書に組み込まれそしてその一部を構成するものであって、この発明の種々の具体例を例示し、そしてこの記載と相俟ってこの発明の原理を説明するために役立つものである。

図面の簡単な説明

第1図は、UDP-グルコース、UDP-グルクロン酸、及びGDP-マンノースの合成のための生合成経路を示すものである。

第2図は、糖混合物中のUDP-グルコース、GDP-マンノース、UDP-ガラクトクロン酸及びUDP-グルクロン酸の高速液体クロマトグラフィーによる分離を示す。各化合物について240-300nmの紫外線スペクトルが示されている。

第3図は、UDP-グルコース、UDP-グルクロン酸、及びUDP-ガラクトクロン酸を欠く変異株(クラス1)の代表であるX872株からの細胞抽出物のクロマトグラムを示す。注目領域において得出するピークのスペクトルが第2図のそれとの比較のために示される。

第4図は、GDP-マンノースを欠く変異株(クラス2)の代表であるX869株からの細胞抽出物のクロマトグラムを示す。注目領域において得出するピークのスペクトルが第2図のそれと比較するために示されている。

第5図は、UDP-グルクロン酸及びUDP-ガラクト

ロン酸を欠く変異株(クラス3)の代表であるX871株からの細胞抽出物のクロマトグラムが示されている。注目の領域において得出するピークのスペクトルが第2図中のそれと比較するために示されている。

第6図は、UDP-グルコース、GDP-マンノース、UDP-グルクロン酸及びUDP-ガラクトースを欠く変異株(クラス4)の代表であるX866株からの細胞抽出物のクロマトグラムを示す。注目の領域において得出するピークのスペクトルが第2のそれと比較するために示されている。

第7図は、変異株X649(クラス1)におけるUDP-グルコース及びUDP-グルクロン酸の合成を防止する欠損を補完するプラスミドpT513の遺伝の段階を示す。

第8図は、変異株X736(クラス3)におけるUDP-グルクロン酸の合成を防止する欠損を補完するプラスミドpA59の遺伝の段階を示す。

第9図は、変異株X652(クラス4)におけるUDP-グルコース、GDP-マンノース及びUDP-グルクロン酸の合成を防止する欠損、並びに変異株X711及びX712(クラス2)におけるGDP-マンノースの合成を防止する欠損を補完するプラスミドpA57の遺伝の段階を示す。

第10図は、パラコッカス・デニトリフィカンス(*Paracoccus denitrificans*)からの細胞抽出物のクロマトグラムを示し、UDP-グルコース及びGDP-マンノースは存在するがしかしUDP-グルクロン酸は存在しないことを示す。

第11図は、第10図に示したパラコッカス・デニトリフ

ィカンスの細胞抽出物中のUDP-グルコース及び他のウリジン含有化合物を確認するスペクトルを示す。

第12図は、第10図に示したパラコッカス・デニトリフィカンスの細胞抽出物中のGDP-マンノースの同定を確認するスペクトルを示し、そしてこの図中に観察される、後に得出する化合物がアデノシン含有化合物であることを示す。

好ましい経路の具体的な記載

この発明は一般に、組換えDNA法を用いての、種々の糖スクレオチドの合成に関する。以下の具体的な記載は、例として、キサンタンガム及び及びその変形物の製造においても有用なUDP-グルコース、GDP-マンノース及びUDP-グルクロン酸の製造の記載を用いる。

糖スクレオチドUDP-グルコース、GDP-マンノース及びUDP-グルクロン酸はキサンタンガムのための生合成経路の直接前駆体である。Vanderslice等、前掲、(引用によりこの明細書に組み入れる)により記載されているようにキサンタンのインビトロ生合成を指令するためにはこれらの化合物のすべてが必要である。糖トランスフェラーゼの特異性のため、ADP-グルコースのごとき他の糖スクレオチドはキサンタンの前駆体として役立つことができない。X.カンベストリスでの前記3種類の必要な糖スクレオチドの合成経路が第1図に示されている。キサントモナス・カンベストリスは検出可能な程度のUDP-ガラクトースを有さず、従ってE.コリのごとき他の細菌において観察されるグルコー

ス-1-ホスフェート-UDP-ガラクトース-ウリジル-トランスフェラーゼ反応は起こり得ない。

キサンタンガムをインビボ生産することができないX.カンベストリスの変異株(Gum-株)は、UDP-グルコース、GDP-マンノース及びUDP-グルクロン酸が供給された場合にキサンタンガムをインビトロ合成する細胞浸透物の能力に基いて2つのクラスに分けることができる。キサンタンをインビトロ生産することができない変異株はキサンタン生合成機構(糖トランスフェラーゼ及びポリメラーゼ)を欠いている。外來基質が供給された場合にキサンタンをインビトロ生産することができる変異株は必要な前駆体をインビボ生産する能力を欠いている。若干のこの第二のクラスの変異株には、グルコースの輸送及びその代謝を欠損しているものが含まれ、この場合キサンタン合成の速度が非常に低い。下記の他のものには質化酵素の正常な補完物を有するが1又は複数の糖スクレオチドそれ自体を合成するために必要な酵素を欠いている。

この様な変異株は、X.カンベストリスのトランスポゾン変異誘発の後Gum-コロニーを拾い、そして添加されたUDP-グルコース、GDP-マンノース及びUDP-グルクロン酸の存在下でキサンタンのインビトロ生合成を分析することにより得られた。特定の糖スクレオチド欠損は、糖スクレオチドを抽出しそして該抽出物を高速液体クロマトグラフィ法を用いて分析することによりインビボで同定された。4種類の変異株のクラスが同定された。これらには、1)

UDP-グルコース、UDP-グルクロン酸及びこれらの化合物に由来する他の糖スクレオチドの合成を欠くもの；2) GDP-マンノース及び関連化合物の合成を欠くもの；3) UDP-グルクロン酸及び関連化合物の合成を欠くが、しかしUDP-グルコースはそうでないもの；並びに4) UDP-グルコース、UDP-グルクロン酸、GDP-マンノース及び関連化合物の合成を欠くものが含まれる。UDP-グルコースのUDP-グルクロン酸への転換は一般降過程であるから、変異株クラス3は明らかにUDP-グルコースデヒドロゲナーゼを欠いている。他の変異株クラスは糖スクレオチドの生合成に必要なインビトロ酵素活性の分析により特徴付けられた。

グルコース-6-ホスフェート及びガラクトース-6-ホスフェートは微生物代謝におけるキ-中間体である。フラクトース-6-ホスフェートからUDP-N-アセチルグルコサミンへの経路はグラム陰性細菌及びグラム陽性細菌に共通である。UDP-N-アセチルグルコサミンは細胞壁中のペプチドグリカンの必須の前駆体である。第1図中に4及び12として示される2種類のピロホスホリラーゼはUDP-グルコース及びGDP-マンノースの生合成における責任ある段階(committed steps)であり、他の生物体においてはグルコース-6-ホスフェートは他のスクレオチドトリホスフェートと反応して他の糖スクレオチド、例えばADP-グルコース及びTDP-グルコースを生成することができる。UDP-グルコース経路において、UDP-グルコース・ピ

ロホスフターゼの遺伝子が例4に記載したようにして単離された。この遺伝子中の変異は、UDP-グルコースのみならずこれに由来する他の糖スクレオチド、すなわちUDP-グルクロン酸及びUDP-ガラクチュロン酸の合成を防止する。UDP-グルコース・デヒドロゲナーゼ(酵素5)の遺伝子も例5に記載するようにして単離された。この遺伝子における変異はUDP-グルクロン酸及びこれに由来する他の糖スクレオチド、すなわちUDP-ガラクチュロン酸の合成を防止する。この様な極効果(polar effects)は次にX、カンベストリスにおけるキサンタン生合成のみならずリボポリサッカライド合成を破壊する。これはその工程のための糖スクレオチドの供給を破壊することによる。

さらに、GDP-マンノースの合成を欠損した変異株が見出された。これらの変異株はマンノース上で正常に増殖し、そしてそれ故に細菌中に共通に見出される酵素である酵素2、すなわちホスホマンノースイソメラーゼを有する。従って、これらは例9に記載するように酵素11及び/又は12を欠損していなければならない。交差ハイブリダイゼーションマッピング及び制限地図は、これらの変異がX、カンベストリスの染色体内の少なくとも別の2ヶ所に存在することを示す。これらの変異株中に挿入された場合にGDP-マンノースの合成を惹起するプラスミドが開発された。このプラスミドの詳細を例6に示す。さらに、このプラスミドは、ホスホグルコムターゼ(pgm)及びGDP-マンノースを生産することができない変異株のCum-欠損を補充する。この変異は

pgmの発現を調節するための制御遺伝子内にあるか、又はpgm構造遺伝子それ自体の中にあるであろう。

ホスホグルコムターゼのみを欠く他の変異株1872が見出された。この明細書に記載する方法により、当業者は応用可能な科学の現状に照らして、この遺伝子の野性型コピーを保持するプラスミドを造成することができる。

すなわち、直接のキサンタン前駆体の合成のための遺伝子が本発明者等によって同定された。これらの遺伝子は、UDP-グルコース、GDP-マンノース及びUDP-グルクロン酸の合成のために必要とされる酵素のための遺伝子を含む。これらの酵素をコードする遺伝子の野性型コピーを含むプラスミドが1ファージ中に造成された遺伝子ライブラリーから得られた。トランスポゾンにより誘導された糖スクレオチド欠損変異株からの染色体DNAのクローン化されたDNAセグメントを保持するベクターRSF1010から成る超塩化プラスミドの³²P-ラベル化プラスミドDNAが同定された。このクローン化断片はトランスポゾン及び周辺(fanking)染色体DNAを含有する。この様な超塩化体はCapage等、前掲、により記載されているようにして容易に単離することができる。3種類の多コピー広宿主域プラスミドが下記の例中に一層詳細に記載される。複製的技法を用いて造成された。これらのプラスミドpAS13、pAS7及びpAS9は、それぞれ前記の変異クラス1、2、及び3の株を補充するDNAを含有する。さらにプラスミドpAS7はクラス4の変異株を補充する。これらのプラスミドのいずれも、キサンタン生合成遺伝子それ自体を含

む領域内の又はそれを挟むDNAと交差ハイブリダイズしない。1ファージの交差ハイブリダイゼーション、制限断片分析及び遺伝的補充により2箇の異なる変異座がプラスミドpAS7中に同定された。これらのプラスミドの造成及び追加の情報が第7図〜第9図に示され、そして後記の例において一層詳細に検討される。

各プラスミドは、適切な補充グループ中の変異株に挿入された場合、生ずるコロニーの結実物の出現によって示されるように、キサンタンガムを生産する変異株の能力を回復せしめる。さらに、プラスミドが欠損した生合成能力を回復したことを確かめるために、補充された株からの抽出物中の糖スクレオチドが試験された。プラスミドpAS13はUDP-グルコース・ピロホスホリラーゼの遺伝子を保持している可能性が最も高い。なぜなら、変異株1649はUDP-グルコースを生産することができず、しかし野性型の量のホスホグルコムターゼを有するからである。さらに、プラスミドpAS13は、1649由来の変異株に挿入された場合、UDP-グルコース・ピロホスホリラーゼを生産する能力を付与する(例8)。この株はグルコース上で正常に増殖し、従って増殖のためのグルコースの利用におけるキサンタン中間体であるグルコース-6-ホスフェートの合成を欠損していない。

前記のごとく、細菌がキサンタンガムを合成するためにはUDP-グルコース、GDP-マンノース及びUDP-グルクロン酸が絶対的に必須である。前駆体としてそれぞれアセチル-コエンザイムA及びホスホエノールピルビン酸を必要

とするアセチル化及びピルビン化によるキサンタンの修飾はガムのレオロジー特性に影響を与えるが、その生合成のためにアセチル化及びピルビン化は必須ではない。さらに、これら後者の前駆体はいずれも細菌代謝の必須成分である。UDP-グルコース、GDP-マンノース及びUDP-グルクロン酸は幾らかの細菌において共通の糖スクレオチドであるがしかしすべての細菌これらのすべてを有するわけではなく、又はキサンタン合成を支持するのに十分な量でこれらを有するわけでもない。X、カンベストリス以外の生物体におけるキサンタン生合成経路の発現は、糖スクレオチド前駆体がその様な代替宿主中で、好ましくはキサンタンガムの経済的生産を支持するのに十分な速度で、合成されることを必要とする。UDP-グルクロン酸をほとんど又は全く有しない若干の代替宿主が同定された(例7)。高速でのキサンタン合成を得るためには、この様な株にUDP-グルコース・デヒドロゲナーゼの遺伝子を保持するDNAを挿入することが必須であろう。

代替宿主中での糖スクレオチド生合成遺伝子の発現のための基本的要件はX、カンベストリスにおけるそれに類似している。必要な1又は複数の遺伝子が染色体への組み込み又はプラスミド上での維持により安定に維持され得るような状態でこれらが宿主に挿入されなければならない。遺伝子産物には、宿主が適切なmRNAを合成しそしてそれを機能的蛋白質に翻訳し、それが好ましくは該新宿主中で相対的に安定であるようなものでなければならない。さらに、宿主は、糖スクレ

オチドそれ自体の合成のための基質及びコファクターを提供することができなければならない。

広宿主域を有する高コピー数プラスミド及び低コピー数プラスミドの両者が存在する。プラスミドへの適切な糖スクレオチド生合成遺伝子の挿入にすでに起っている。プラスミドをE. コリからX.カンベストリスの変異株に移行せしめたのと同様な態様でこの様なプラスミドを代替宿主に導入するために形質転換(transformation)又は接合(conjugation)を用いることができる。これらの広宿主域プラスミドは一般にグラム陰性細菌に感染するであろう。所望により、X.カンベストリス遺伝子をグラム陽性細菌に移行せしめることができるシャトルベクターが存在する。プラスミドの挿入及び維持は標準的方法により確認することができる。

代替宿主中での遺伝子の発現は幾つかの方法でモニターすることができる。すなわち、遺伝子から転写されたmRNAをハイブリダイゼーションにより検出することができ、蛋白質自体をイムノアッセイ又は機能測定により検出することができ、そしてあらかじめ欠損していた糖スクレオチドを確立されたクロマトグラフ法により同定することができる。1又は幾つかのこれらの技法による分析が、所望により、発現を最適化するための遺伝子産物の調整を可能にするはずである。

類似の外部環境、例えばpH及び温度が維持される場合に特にそうであるが、代替宿主の細胞内環境はX.カンベストリスのそれにおそらく類似しているであろう。キサンタンの生合成に広い温度範囲、すなわち12℃〜37℃において行わ

れるが、その速度は27℃と37℃の間において最高であることがインビボ研究から知られる。明らかに、糖スクレオチド前駆体の合成を担当する酵素はこの範囲において機能しなければならない。最初の分析は27℃〜30℃において行われるであろう。

種々の宿主での特定の糖スクレオチドの生産への本発明の技法の広範な適用は、この明細書に含まれる教示に照らして当業による可能性の範囲内にあるものと理解すべきである。従って、下記の例は単に例示的なものであり、請求の範囲のごとく、この発明を限定するものではない。

例1

この例は、インビボにおいてGum-である種々のX.カンベストリス株において同定される特定の糖スクレオチド欠損について検討する。

糖スクレオチド合成が欠損している変異株の最初の収量物を、Capage等、前掲、に記載されているようにして、トランスボゾン変異誘発の後にインビボでキサンタンを生産することができない。X.カンベストリス株のから得た。幾つかのGum-株は、糖スクレオチドUDP-グルコース、GDP-マンノース及びUDP-グルクロン酸が供給された場合にインビトロでキサンタンを生産することができた。これらの変異株は、キサンタンそれ自体の生合成を欠損しているのではなく、むしろ糖スクレオチド合成を欠損していた。次に、これらの変異株が色素トルイジンブルーに対して感受性であることが見出された。他のGum-株をトルイジンブルー感

受性についてスクリーニングすることにより追加の糖スクレオチド変異株が得られた。これらの株は、野性型X.カンベストリス及びキサンタンの生合成それ自体を欠損するGum-変異株を取す幾つかの毒性(virulent)ファージに対して耐性であることが証明された。

インビトロにおいてGum+であるがインビボにおいてGum-である株において特定の糖スクレオチド欠損を同定するために次の方法が用いられた。各株からの単離されたコロニーを拾い上げ、そして125mlのエレンマイヤーフラスコ中2%のグルコースを含むYM培地(酵母エキス3g、マルトエキス3g及びペプトン5g/l)10mlに接種した。培養物を30℃、250rpmにて24時間、又は濁りが出るまでインキュベートした。5%の接種物をYM培地から炭素源としてグルコースを含有する改変PACE培地(5gのKH₂PO₄、5gのK₂HPO₄、0.2gのH₂SO₄・7H₂O、0.53gの(NH₄)₂SO₄、0.006gのH₂BO₃、0.006gのZnCl₂、0.003gのFeCl₃・6H₂O及び0.02gのCaCl₂・2H₂O)に移し、そして30℃にて24時間増殖せしめた。培養物を遠心分離により収得し、PACE培地2回洗浄し、そして600nmでの吸光が100となるのに十分な容量のPACE中に再懸濁した。サンプル1.5mlを、濃度を20mg/mlにするのに十分な量のグルコースを含む50mlのエレンマイヤーフラスコに入れた。各サンプルを30℃の水浴中で400rpmにて10分間インキュベートし、次に1mlを取り出し、そしてエッペンドルフ遠心チューブ中0.1mlの11N塩酸に加えた。このチューブにキャップを付し、内容

物を渦動攪拌器中で5秒間混合し、次にチューブをドライアイス-アルコール浴中に入れた。すべてのサンプルを処理した後、チューブをドライアイスから取り出し、室温にて溶解し、そして5分間遠心して細胞破片をペレット化した。上清を、あらかじめ冷却した15mlのコニカル遠心チューブに入れ、そしてドライアイス-アルコール浴中で凍結した。凍結したサンプルを凍結乾燥機に入れ、そして乾燥した。各チューブの内容物を、トリエチルアミン(アルドリッチ)により、pH6.5に調整された40mMリン酸から成るBPLC緩衝液0.2mlに溶解した。サンプルを0.45µmフィルターを通して濾過してマイクロサンプルバイアルに入れ、そして46mm×250mmのC18逆相イオン対カラムに注入することにより40℃、0.8ml/分の速度で分析した。同一の条件下で行われた標準と保持時間を比較することにより、そして柱目の領域で溶出する化合物のスペクトルを試験することにより、糖スクレオチドを同定した。

糖スクレオチド変異株の4つのクラスを次の方法を用いて同定した。

(1)UDP-グルコース及びUDP-グルクロン酸を合成することができない変異株；

(2)GDP-マンノースを合成することができない変異株；

(3)UDP-グルコースを合成することができるが、しかしUDP-グルクロン酸を合成することができない変異株；及び

(4) UDP-グルコース、GDP-マンノース及びUDP-グルクロン酸を合成することができない変異株。

各変異株クラスの代表的なクロマトグラム及び標準的なベクトルを第2図～第6図に示す。クラス1、3、及び4の変異株はまた、X、カンベストリスのリボポリサッカライド前駆体であるUDP-ガラクトクロン酸を合成しなかった。これらのデータに基づけば、X、カンベストリスはUDP-グルクロン酸からUDP-ガラクトクロン酸を合成しなければならぬ。

X、カンベストリスの野性型株からの抽出物にキサンタンの生合成のために必要な総スクレオチドのすべてを有していた。第1表に示すように、キサンタンの生合成経路それぞれに欠損を有するCum-変異株は、野性型細胞よりも高速度の前駆体総スクレオチドを有していた。

第1表

野性型X、カンベストリス及びキサンタン生合成経路自体に欠損を有する変異株中のUDP-グルコース、GDP-マンノース及びUDP-グルクロン酸の相対量

	UDP- グルコース	GDP- マンノース	UDP- グルクロン酸
X、カンベストリスS4-L	1.0	1.0	1.0
X、カンベストリスX648	2.5	4.7	2.0
X、カンベストリスX655	3.5	5.4	1.9
X、カンベストリスX705	4.2	7.1	2.0

及び細胞破片を除去した。パスツールピペットを用いて上清を注意深く除去し、次に $130,000 \times g$ の平均遠心力にて回転バケットローター中で遠心分離することにより細胞質成分と膜成分とに分離した。細胞質成分を含有する上清をデカントし、そして -70°C にて凍結した。各膜含有ペレットを 1.0 ml の 10M NaCl 、緩衝液に再懸濁し、そしてやはり -70°C にて凍結した。総スクレオチド合成のために必要な酵素は細胞質成分中に通常見出される。細胞膜からの細胞質成分の分離がNADPの還元と共役する酵素的測定を容易にする。NADPHオキシダーゼは膜結合酵素であり、そして除去又は不活性化されない限り、還元されたビリジンスクレオチド(この過程が反応を進捗するために使用される)を急速に再酸化することができる。

各細胞質抽出物中の蛋白質濃度を、標準としてウシ血清アルブミンを用いて、Lowry等、J. Biol. Chem. 193: 265-275 (1951) (引用により特にこの明細書に組み入れる)を用いて決定した。各抽出物中のグルコース-6-ホスフェート・デヒドロゲナーゼの活性は、グルコース-6-ホスフェートの6-ホスホグルコン酸への酸化中に生成するNADPHの量に、 340nm における吸光の増加を追跡することにより決定された。この酵素はX、カンベストリスによるグルコースの代謝におけるキー酵素であり、そして内部対照として役立つ。反応条件は第2表の脚注に記載する。

グルコース-6-ホスフェートをUDP-グルコースの直接の前駆体であるグルコース-1-ホスフェートに転換する

これらのデータは、野性型細胞におけるキサンタンの生成の速度が前駆体総スクレオチドの供給により制限されることを示している。

例2

この例は、総スクレオチド合成を欠くX、カンベストリスのトランスポゾンにより誘導された変異株におけるホスホグルコムターゼ活性を記載する。

総スクレオチド合成を欠くことがあらかじめ見出されているトランスポゾン変異株から細胞質成分及び膜成分を調整した。陽性対照として役立つためにX、カンベストリスS4-(NRRL 81459)の抽出物も調整した。培養物を、プレート上の単離されたコロニーから1%のグルコースを含むYM培地に移し、そしてチューブローラー上で定常期まで増殖せしめた。1%のグルコースを含有するYT培地(8gのトリプトン、5gの酵母エキス及び5gのNaCl/g)100mlを収容する500mlフラスコ2本に2mlの培養物を接種し、そして 30°C のインキュベーター中300rpmの振とう機上に置いた。24時間後、培養物を一緒にし、そして遠心分離した。細胞ペレットを100mlのリン酸緩衝化塩溶液(pH 7.2)中で2回洗浄し、次に 1.0 M NaCl を含有する 5.0 M MOPS 緩衝液(pH 7.2)中に 2.0 ml/vol となるように再懸濁した。細胞から残留培地を除去するためにこの方法を用いた。15,000psiにてフレンチプレスを2回通すことによって細胞膜を破壊した。細胞溶解物をDNAアーゼで処理することにより粘度を低下せしめ、次に $2,500 \times g$ にて遠心分離して未破砕細胞

ホスホグルコムターゼは細胞質成分において測定した。ムターゼ活性は可逆的であるため、基質としてグルコース-1-ホスフェートを用いた。さらに、シグマ・ケミカルネエから購入した精製されたグルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼを反応混合物に過剰に加えた。NADPHの形成速度が反応体中に存在するホスホグルコムターゼによりグルコース-6-ホスフェートが生成する速度を示すものである。反応条件及びアッセイの結果を第2表に要約する。

X. カンベストリスのトランスボゾン-誘導スクレオチド・変異株の細胞質抽出物中のグルコース-6-ホスフェート・デヒドロゲナーゼ (G6PD) 及びホスホグルコムターゼ (PGM) 活性。酵素活性は $\mu\text{mol} / \text{分} / \text{mg}$ 蛋白質として示す。

図 株	UDP- グルコース	GDP- マンノース	UDP- グルクロン酸	G6PD ^(a)	PGM ^(a)
S4-L	+	-	+	268	238
X649	-	-	+	182	411
X652	-	-	-	255	2
X711	+	-	+	144	191
X712	+	-	+	154	223
X736	+	+	-	184	496
X826	+	+	-	154	276
X871	+	-	-	97	348
X828	-	-	-	148	7
X866	-	-	-	151	1
X869	+	-	-	163	535
X872 ^(a)	-	-	-	104	2

(a) 0.05 M の細胞質画分 (約 1.0 mg / ml の蛋白質) を添加することにより反応を開始した。反応混合物は 4.0 mM Tris-HCl (pH 8.6)、5 mM グルコース-6-ホスフェート、1.6 mM NADP 及び 1.5 mM MgCl_2 を 1.0 ml の合計容量中に含有した。

同様に、X652 はホスホグルコムターゼ活性をほとんど又は全く有しない。GDP-マンノース合成のみに欠損を有する変異株 X657、X711、X712 及び X869 株は、正常なホスホグルコムターゼ活性を有する。X736、X826 及び X871 株は UDP-グルクロン酸を生産することができない。これらも正常なホスホグルコムターゼ活性を有する。

例 3

この例は、Tal0 で誘導された変異株中の糖スクレオチド欠損のマッピングの方法を記載する。

糖スクレオチド代謝に欠損を有する Tal0-誘導変異株のすべてについて、各変異株からの Tal0-周辺 (flanking) 染色体配列をクローニングすることによりプラスミドプローブを得た。1 バンクをプローブすることにより、各プローブにハイブリダイズするがしかし X. カンベストリスの野性型 DNA のセグメントを担持する 1 組の染色体を得た。これらのファージをブランク精製し、そしてこれを用いて、Tal0 及び周辺 (flanking) DNA を含有するプラスミドプローブへの交差ハイブリダイズにより糖スクレオチド変異をマッピングした。

いずれの糖スクレオチドプローブも、キサンタン生合成経路それ自体の遺伝子を含有する DNA 領域内にマップしなかった。変異株 X649 について野性型 DNA を含有するファージは他の糖スクレオチドプローブのいずれともハイブリダイズしなかった。同様に、変異株 X736 DNA 中の Tal0 挿入領域からの野性型 DNA を含有するファージは他の糖スクレオチドプローブにハイブリダイズしなかった。従って、これらの株中

(b) 反応条件は G6PD の場合と同様であるが、グルコース-6-ホスフェートの代わりにグルコース-1-ホスフェートを使用した。反応混合物はさらに 1 mM ジチオスレイトール、0.2 mM グルコース-1, 6-ジホスフェート、及びシグマ・ケミカル社製の 10 ユニットの G6PD を含有した。

(c) ATCC № 53471 として寄託されている。

すべての抽出物は 97-268 $\mu\text{mol} / \text{分} / \text{mg}$ 蛋白質の範囲の有意な活性のグルコース-6-ホスフェート・デヒドロゲナーゼを有していた。UDP-グルコースを合成することができる変異株から調製されたすべての抽出物において、ホスホグルコムターゼ活性は 191 $\mu\text{mol} / \text{分} / \text{mg}$ 蛋白質以上であった。UDP-グルコースを合成することができない、X649 以外のすべての変異株 (X828、X652、X866、及び X872) からの抽出物はほとんど又は全くホスホグルコムターゼ活性を有しなかった。この様な欠損は UDP-グルコースの合成を防止するために十分である。

X649 株は糖スクレオチドの UDP-グルコース系統を生産することができない。表現形質的には、これは Ta903 変異株である X872 株に類似する。しかしながら、X649 は正常なホスホグルコムターゼ活性を有するが、X872 はこの酵素を欠損している。X649 は UDP-グルコース・ピロホスホリラーゼそれ自体に欠損を有するに違いない。

X652 株は糖スクレオチドの UDP-グルコース系統及び GDP-マンノース系統を生産することができない。これらの糖スクレオチドを欠く Ta903 変異株である X828 及び X866 と

の欠損遺伝子に他の糖スクレオチド遺伝子にリンクしていない。

プラスミド pTX652、pTX657、pTX711 及び pTX712 は、クローン化された X. カンベストリス DNA を含有する組換え 1 ファージのオーバーラップするセットにハイブリダイズした。プラスミド pTX711 は、pTX652、pTX657 及び pTX712 にハイブリダイズする 1 ファージのすべてではないが幾つかにハイブリダイズした。

X652 はまた UDP-グルコース又は UDP-グルクロン酸を生産することができないから、X652 株中の変異と GDP-マンノースの合成を防止する変異との関連は予想外であった。X652 中の変異は UDP-グルコース及び GDP-マンノースの合成に影響を与えるトランスアクト (transacting) 制御遺伝子中に、又は UDP-グルコース合成のために必須の酵素をコードするがしかし GDP-マンノース遺伝子の発現に抑制効果 (polar effect) を発現する構造遺伝子中に存在するのであろう。

例 4

この例は、プラスミド pTS13 による X649 株中の変異の補完を説明する。

すべての糖スクレオチド変異株をトランスボゾン変異誘発により得た。X. カンベストリスのゲノム DNA の 1 ライブラリーを、UDP-グルコース及び UDP-グルクロン酸の合成に欠損を有する変異株 X649 からのトランスボゾン Tal0-周辺 (flanking) 染色体配列をクローニングする (Capege 等、前

用、に記載されているようにして) ことにより誘導されたプラスミドpTX649を用いてアプローブした。pTX649アプローブにハイブリダイズする1組換体10個が同定された。

各1クローンのDNAについて制限消化及びゲル電気泳動を行った。これらの消化パターンにおいて、X649株中では変異しているX、カンベストリスDNAの野性型断片が同定された。この6.5 kb PstI断片を分取用アガロースゲルからの電気泳動により精製した。このPstI断片をpBR322のPstI部位にクローニングしてプラスミドpT16.5を作った。pT16.5及びプラスミドRSF1010をEcoRIで消化し、そして両プラスミドを一緒に連結することにより他のプラスミドを生成した。形質転換後にE. コリにストレプトマイシン耐性及びテトラサイクリン耐性を付与する能力によりハイブリッドプラスミドを選択した。このキメラプラスミドpT.13は6.5 kb PstI断片を含有する(第7図)。

次に、このプラスミドを、pRX2013により指令されるトリパレント・コンジュガル・トランスファー(triparental conjugal transfer)によりX、カンベストリスX649株に移行せしめた。

pT513により阻害されたクローン化5.5 kb断片は変異株X649を補充する。X649への移行のためのpT513のメイティング(mating)混合物をRII及びStrep上にプレートした場合、コロニーのすべてがGum+であり、そして野性型と区別することができなかった。3個のGum+キソ接合体(exo-conjugate)を分析し、そしてこれらがプラスミドを含有する。

P-グルコースを生成する能力を付与することができる。

例3.

この例は、プラスミドpA59によるX736株中の変異の補充を説明する。

X736中Tet10挿入の領域からのX、カンベストリス染色体DNAを含有する5個の1ファージ1組を単離した。

これらのファージは、プラスミドpTX736にハイブリダイズする組換体ファージについてスクリーニングすることにより1バンク遺伝子から単離された。プラスミドpTX736は、変異表現型を生じさせるTet10挿入を含む変異株X736からの染色体DNAのPstI断片がプラスミドベクターRSF1010にクローニングされて成る。

これらの1736(-)ファージをサザンブロットハイブリダイゼーションによりスクリーニングして、注目の野性型PstI断片を含有する比較的大きなDNA断片を同定した。1組換体からのDNAを幾つかの制限エンドスクレアーゼにより消化し、そして同じセットの酵素で切断された野性型染色体DNAの対照と共にアガロースゲル上に泳動せしめた。次に、この消化物を、放射性ラベルされたpTX736プラスミドDNAによりアプローブした。幾つかの異なる1736(-)単離体のSalI消化物がこのアプローブとハイブリダイズする9 kbの断片をもたらした。野性型染色体DNAのSalI消化物もこのアプローブにアニールする9 kbのバンドを生成した。1736組換体は比較的小数のSalI断片を生成したので、1からpRW79へのショットガンクローニングを行った。プラスミドベクター

ことが示された。さらに、プラスミド・キラー(criI)・実験を行った。この実験においては、X649(pT513)を、プラスミドの喪失を促進する条件で増殖せしめ、そして次にプラスミドを選択するであろういかなる薬剤も存在しない状態でプレートした。幾つかの実験において、これらのプレート中に有意な頻度(10-50%)でGum+コロニーが観察された。この様なGum+単離体3個を試験し、プラスミドpT513が失われていることが示された。しかしながら、この実験からのGum+単離3個はすべてpT513を保持していることが見出された。プラスミドの存在とGum+表現型との間の相関関係は、最初のGum+の性質が組換によるものではなく、むしろプラスミドに阻持された遺伝子の発現によるものであることを主張している。

X649株及びpT513を含有するX649株から抽出物を調製した。プラスミドを有するX649からの抽出物は、スペクトル分析及び保持時間により決定する場合、UDP-グルコースを有していた。X649のみからの抽出物はそうではなかった。

X649からの抽出物は正常な量のホスホグルコムターゼを有する(例1)から、UDP-グルコースの合成を防止する酵素の欠損はUDP-グルコース・ピロホスホリラーゼをコードする遺伝子中に位置しなければならない。この遺伝子はプラスミドpT513中に含まれている。このプラスミドはRSF1010のキメラであるから、X、カンベストリス以外のグラム陰性細菌に移行することができ、そして該細菌がグルコース-1-ホスフェートを生成する能力を有するならば、それにUD

pRW79は、テトラサイクリン耐性遺伝子内に位置するユニークSalI部位を含有する。従って、pRW79及び1736(+)DNAの両者をSalIにより消化し、そして消化生成物を一緒に連結した。連結反応物を用いてE. コリを形質転換し、アンピシリン耐性形質転換体を選択し、そしてそれらの650個をテトラサイクリンに対する感受性について試験して組換体プラスミドを同定した。10個のAmp^rTet^r単離体が見出された。プラスミドDNAをこれらの形質転換体から抽出し、そして制限エンドスクレアーゼ消化及びアガロースゲル電気泳動により分析した。注目の組換体が見出された。クローン化された9 kb SalI断片を含有することプラスミドをpA59と命名した(第8図)。

X736 Gum-欠損の補充を求めて、このプラスミドをX、カンベストリスに移行せしめた。プラスミドpA59をX736のリファンピシン耐性誘導株(X1017と称する)及びRII^r野性型(Gum+)株X77に動員(mobilize)した。これらの動員は、pRX2013によって指令される標準的トリパレント・コンジュガル・トランスファー(triparental conjugal transfer)により行った。リファンピシン(E. コリ供与体及び動員株(mobilizer strains)に対して選択するため)及びストレプトマイシン(pA59の存在について選択するため)上にプレートすることにより、注目のプラスミドを阻持するX、カンベストリス接合体(conjugant)を選択した。X1017へのpA59のメイティング(mating)のRII^r及びStrep^r子孫はもっぱらGum+であった。3個のGum+誘導株を選択し、そして

プラスミドについて選択した。3個すべてが明らかにプラスミドpA59を含有していること、及び制限エンドヌクレアーゼ消化により決定する場合このプラスミドはなんらの明瞭な転移(rearrangement)を受けていないことが見出された。さらに、プラスミドの複製(curing)実験を行った。この実験においては、X1017(pA59)をプラスミドの喪失を促進する条件下で増殖せしめ、そして次にプラスミドを選択するであろういかなる薬剤も存在しない状態でプレートした。このプレート中で、有意な頻度でGum⁻コロニーが観察された。このようなGum⁻単離体3個を試験し、そしてプラスミドpA59が失われていることが見出された。しかしながら、この実験からの3個のGum⁺単離体はすべてpA59を維持していることが見出された。プラスミドの存在とGum⁺表現型との間の相関関係は、Gum⁺の性質が組換えによるものでなくむしろプラスミドに担持された遺伝子の発現によるものであることを主張している。

変異株X736はUDP-グルコースを生産することができるがしかしUDP-グルクロン酸を生産することができないから、UDP-グルコースのUDP-グルクロン酸への転換を担当する単一の酵素UDP-グルコース・デヒドロゲナーゼが欠損している可能性が最も高い。この酵素のための遺伝子はプラスミドpA59上に含まれる。

例6.

この例はプラスミドpA57によるX652、X711及びX712株中の変異の補充を説明する。

X652からのX1043の異なる抗生物質耐性が、これに続くE. コリ供与体に対する逆の選択を促進した。プラスミドpA57の移行の後、X1043はGum⁺表現型に回復した。菌株がpA57を失った場合この表現型はGum⁻に復帰し、Gum⁺表現型はX652株中でトランスポゾン挿入により不活性化された染色体DNAのプラスミドにより担持されたコピーの発現によるものであることが示された。

例3において示したように、X652、X711及びX712株中の変異はX.カンベストリス染色体上に繋がっている。プラスミドpA57は、トリバレンタル・メイティンクにおける接合による変異株X711及びX712への移行の後、Gum⁺表現型を回復した。補充された株はプラスミドを失った場合Gum⁻になった。

X711及びX712株はX652株と同様にGDP-マンノースを合成することができない。プラスミドpA57はこの能力を回復せしめ、そしてそれ故にGDP-マンノースの合成に必要な酵素をコードする遺伝子を含有している。

X652はまたUDP-グルコースの欠損を有する。この欠損はX652株におけるホスホグルコムターゼの欠損(例2)と一致する。GDP-マンノース生合成に必要な酵素をコードする遺伝子を含有する同じリンケージがホスホグルコムターゼの構造遺伝子又はホスホグルコムターゼの発現を調節する制御遺伝子をも含有する。

例7.

この例は代替宿主における糖スクレオチドの蓄積を説明す

糖スクレオチド変異株X652からのトランスポゾンTol10+周辺(flaablag)染色体配列をプラスミドp25F1010にクローニングすることによって誘導されたプラスミドpTX652により、X.カンベストリスのゲノムDNAのライブラリーをプローブした。変異株X652はUDP-グルコース、GDP-マンノース又はUDP-グルクロン酸を生産しない。pTX652にハイブリダイズする組換えファージをブランク精製した。pTX652によりプローブされたこれらのファージの新規消化物のサザンブロットは、トランスポゾン挿入の部位に対応する野生配列を含有する9 kb B_{am}H I断片を同定した。

この9 kb B_{am}H I断片を精製し、そしてプラスミドpH79のB_{am}H I部位に連結した。連結混合物を用いてE. コリを形質転換し、そしてアンピシリン耐性形質転換体を選択した。これらをテトラサイクリン感受性についてスクリーニングした。pH79のB_{am}H I部位への外来DNAの挿入によりテトラサイクリンに対する耐性をコードする遺伝子が不活性化されるであろう。9 kb B_{am}H I断片を含有するプラスミドpA57をこの方法により得る(第9図)。

次に、pRX2013により指令されるトリバレンタル・コンジュガル・トランスファーにより、プラスミドをE. コリからX.カンベストリスX1043に移した。pTX652をX.カンベストリス株X77(X.カンベストリスNRRL-B1459 S4-Lから得られたリファンピシン耐性変異株)にメイティンクし、そしてテトラサイクリン選択を課することによって相同性組換えを行わせることによりX.カンベストリスX1043が得られた。

る。

パラコッカス・デニトリフィカンス(*Paracoccus denitrificans*) (ATCC 17741)、シュードモナス・ストツツェリ(*Pseudomonas stutzeri*) (ATCC 17582)、及びシュードモナス・パーフェクトマリナ(*Pseudomonas perfectomarina*) (ATCC 14405)中の糖スクレオチドを、X.カンベストリスのために開発された方法を用いて分析した。すべての生物を、炭素源として2%グルコースを用いて12時間増殖せしめた。細胞を集め、洗浄し、そして600nmにおける吸光が100となる様に再懸濁した。この細胞ペレットは、機能的増殖のために要求されるテトラクロームの合成を抑制解除した脱窒細菌に典型的なピンク色を有していた(増殖中の脱窒制限に典型的な反応)。次に、2.5mM硝酸塩を追加の電子受容体としてインキュベーション混合物に含めた。細胞懸濁液を2.0mMグルコースと共に、硝酸塩を伴って又は伴わないで5分間インキュベートし、そして例1に記載したようにして塩酸により抽出した。抽出物を濃縮乾燥し、TEA-リン酸緩衝液中に溶解し、そしてHPLCにより分析した。注目領域中のピークのスペクトルにより確認する場合、パラコッカス・デニトリフィカンスはUDP-グルコース及びGDP-マンノースを有していたが、UDP-グルクロン酸の量は検出不能であった(第10-12図)。同様に、シュードモナス・パーフェクトマリナ及びシュードモナス・ストツツェリはUDP-グルコース及びGDP-マンノースを有していた。いずれの生物からの抽出物中にもUDP-グルクロン酸は検出されなかった。

例3において記載したようにして、トリバレンタル・メイ
ティングにおいて接合により、プラスミドpAS9をE. コリ
与体からこれら3種類の細菌のすべてに挿入して、UDP-
グルクロン酸を合成することができるようこれらの株を
修正することが意図される。

例3

この例は、糖スクレオチド合成に欠損を有するX.カンベ
ストリスのトランスポゾン誘導変異株におけるUDP-グル
コース・ピロホスホリラーゼ活性を記載する。

X649株はUDP-グルコースを生産することができなかつ
た(例1)が、しかしホスホグルコミターゼ活性を有してい
た(例2)。下記の実験は、この株中の変異がUDP-グル
コース・ピロホスホリラーゼ活性に影響を与えること、及び
UDP-グルコース・ピロホスホリラーゼの遺伝子がプラス
ミドpTS13上に含まれることを示す。

UDP-グルコース・ピロホスホリラーゼ活性の分析を容
易にするため、X649株のTa10挿入を担持するストレプトマイ
シン感受性リファンピシン耐性株3個を造成した。1つのこ
のような株X1023は、Capage等、前掲、により記載されてい
る遺伝子置換法により造成された。他の2個の株X1024及び
X1025は染色体動員(mobilization)により造成された。X649
(例4)の糖スクレオチド欠損を補完するプラスミドpTS13
をX1023、X1024及びX1025に挿入して、それぞれX1041、X1039
及びX1040を得た。さらに、プラスミドpTS13をCum-リ
ファンピシン耐性株X77に挿入してX1052株を生じさせた。

コース・ピロホスホリラーゼ遺伝子を担持していることを示
すものである。

pTS13がUDP-グルコース・ピロホスホリラーゼ遺伝子
を有することを確認するため、電子受容体としてNADPを用い
て他の変異株により追加の実験を行った。結果を第3表に要
約する。異なる抽出物濃度における多数の測定の結果が示され
る。

表3

X.カンベストリスの細胞質成分中のUDP-グルコース・
ピロホスホリラーゼ活性:1分間、蛋白質1mgあたり生成する
NADPHの量nmolとして表示

菌株	UDP-グルコース・ピロホスホリラーゼ
X77	6.74, 3.46, 3.18
X1023	1.83
X1024	1.12
X1025	0.57
X1040	23.0, 8.83
X1041	41.1, 45.9, 42.6, 39.3
X1052	40.3, 42.1, 43.8

X1023、X1024及びX1025株はピロホスホリラーゼ活性をは
ほとんど又は全く有しなかった。X1025及びX1023株中の欠損
を補完するプラスミドを含有するX1040及びX1041株は高い

これらの株、及び陽性対照として設立したX.カンベストリ
スX77から例2に記載したようにして細胞質成分を調製した。
UDP-グルコース・ピロホスホリラーゼはグルコース-1-
ホスフェートとUTPとをUDP-グルコースとピロホス
フェートとに転換する。この反応は可逆的である。Lieber-
man等、Proc.Natl.Acad.Sci. USA 65: 625-632(1970)(引用
によりこの明細書に組み入れる)により記載されているよう
にして、ホスホグルコミターゼ及びグルコース-6-ホスフ
ェート・デヒドロゲナーゼの添加によりNAD又はNADPの還
元にUDP-グルコースからのグルコース-1-ホスフェ
ートの形成をカップリングすることによりUDP-グルコース
・ピロホスホリラーゼ活性を測定した。これらの測定におい
ては、Tris緩衝液の代りにHEPES緩衝液を使用し、そして反応
混合物からリン酸ナトリウムを省略した。無化ナトリウム
(5mM)を添加してピロホスホリラーゼ活性を阻害した。

NADを用いる実験において、X1023株は5.4nmol/mg蛋白質/分のUDP-グルコース・ピロホスホリラーゼ活性を
有しており、これは、野性型株X77のUDP-グルコース・
ピロホスホリラーゼ活性72.2nmol/mg蛋白質/分の10%
未満であった。X1023反応混合物における340nmの吸光の増
加のほとんどすべてがUDP-グルコース・ピロホスホリラ
ーゼ活性それ自体によるものではなく競争反応によるもので
あった。X1039株は18.7nmol/mg蛋白質/分のUDPGピロホ
スホリラーゼ活性を有しており、X1023における活性より4
倍高かった。この結果は、プラスミドpTS13がUDP-グル

活性を有していた。同様に、X1052はプラスミドpTS13を
含有しない野性型株X77より非常に高い活性を有していた。

pTS13は高コピー数プラスミドであるプラスミドpRSF1010に
由来するから、この活性の差異は遺伝子量効果を反映したもの
であろう。X77及びX1040株の細胞質抽出物を再度調整し、
今回は恒温サンプルコンパートメントを装着した分光光度計
中でピロホスホリラーゼ活性を直接測定した。比活性は、

X77及びX1040についてそれぞれ149及び33.4nmol/mg蛋白質/分であった。

これらの結果は、X649中の変異がUDP-グルコース・ピ
ロホスホリラーゼ活性の除去によりUDP-グルコースの合
成を防止することを確認するものである。この活性は、UDP
-グルコース・ピロホスホリラーゼの遺伝子を担持してい
るに違いないプラスミドpTS13により回復される。

UDP-グルコース・ピロホスホリラーゼ活性をさらに、
Ta903ゾリーの糖スクレオチド変異株からの細胞質抽出物
中で測定した。反応混合物はNADPを含有しなかった。結果を
第4表に示す。

第4表

ホスホグルコミターゼ (PGM) 活性があらかじめ測定された 1a903 株スクレオチド変異株の抽出物中の UDP-グルコース・ピロホスホリラーゼ活性 (UDPG-PPアーゼ: $\mu\text{mol}/\text{分}/\text{mg}$ 蛋白質)

菌株	欠失株スクレオチド	UDPG-PPアーゼ
X77		9.4
X826	UDP-GlcA	10.5
X871	UDP-GlcA	31.1
X828	UDP-Glc, UDP-GlcA, GDP-mnn	28.5
X866	UDP-Glc, UDP-GlcA, GDP-mnn	17.3
X869	GDP-mnn	5.88
X872	UDP-Glc, UDP-GlcA	86.2

すべての株が測定可能なピロホスホリラーゼ活性を有していた。ホスホグルコミターゼ活性の不存在は、X828, X866及びX872株がUDP-グルコースを合成することができないことを説明するのに十分である。

例9

この例は糖スクレオチド合成に欠損を有する、X, カンベストリスのトランスボゾン誘導変異株におけるホスホマンノミターゼ活性を記載する。

あらかじめ測定された糖スクレオチド変異株 (例1) から細胞質抽出物を例2に記載したようにして調製した。マン

(2000 ユニット/ ml) 及び0.05 ml のG6PD (1000 ユニット/ ml) の混合物から、1 ユニットは1分間に1.0 μmol の基質を生成物に転換する量。

反応速度は数分間後に直線的になる。この時間はリン酸化された糖中間体が定常濃度に達するために必要な時間である。これらの直線的速度は反応混合物に含められた細胞質抽出物の量に比例する。便宜上、実際の反応速度を決定するのではなく、マンノース-1-ホスフェートの存在下でのXADPH₂の生成と非存在下でのそれとを3-5分間のインキュベーションの後に比較することによりPMM活性を決定した。結果を第6表に要約する。

ノース-6-ホスフェートをGDP-マンノース・ピロホスホリラーゼの基質であるマンノース-1-ホスフェートに転換する酵素であるホスホマンノミターゼ (PMM) について、これらの抽出物を測定した。酵素反応は可逆的である。

測定 (第5表) はPindar及びBucke, Biochem. J. 152: 617-622 (1975) (引用によりこの明細書に組み入れる) の方法から改変したものであり、この方法においては酵素ホスホマンノース・イソメラーゼ (PMI)、ホスホグルコスイソメラーゼ (PGI) 及びグルコース-6-ホスフェート・デヒドロゲナーゼ (G6PD) の添加により、マンノース-6-ホスフェートの生成がXADPHの還元によってカップリングされる。

第5表

キナントモナス・カンベストリスにおけるホスホマンノミターゼ活性の測定のための反応混合物

溶	液	ml
10 mM XADPH		0.10
10 mM マンノース-1-ホスフェート		0.10
1 mM グルコース-1, 6-ジホスフェート		0.02
カップリング酵素 (1)		0.02
100 mM システイン HCl		0.05
100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.9)		0.50
水及び抽出物		0.21

(1) 0.10 ml のPMI (380 ユニット/ ml)、0.05 ml のPGI

第6表

GDP-マンノースを合成することができない糖スクレオチド変異株の細胞質抽出物中のホスホマンノミターゼ活性。マンノース-1-ホスフェート (MI P) を伴わないか又は伴う3-5分間のインキュベーションの後に 340nmにおける吸光を測定した。

菌株	糖スクレオチド欠損	340nmにおける吸光のHIPに依存する増加
652	GDP-mnn, UDPGlc, UDPGlcA	有 り
711	GDP-mnn	有 り
712	GDP-mnn	有 り
828	GDP-mnn, UDPGlc, UDPGlcA	有 り
866	GDP-mnn, UDPGlc, UDPGlcA	無 し
869	GDP-mnn	有 り

最初にX866抽出物がマンノース-1-ホスフェートの添加後に 340nmにおける吸光の増加を示した。しかしながら、この増加をホスホマンノミターゼ活性に帰することはできなかった。反応速度は直線的ではなく、得られるべき最大吸光よりはるかに下方で平らになった。X866の抽出物は、グルコース-6-ホスフェート・デヒドロゲナーゼ活性について測定した際なお活性であった (0.77 $\mu\text{mol}/\text{分}/\text{mg}$)。X866株は明らかにPMM活性を欠損している。

他のすべてのGDP-マンノース変異株はホスホマンノミターゼ活性を有していた。これらの変異株においてGDP-

マンノースの合成を防止する欠損は GDP-マンノース・ピロホスホリラーゼでなければならない。GDP-マンノースの合成を防止する、X632、X711及びX712中の欠損はプラスミド p457によって修正されるから、このプラスミドは GDP-マンノース・ピロホスホリラーゼの遺伝子を担持しているに違いない。

この発明の方法及び生成物において種の変更を行うことができることが当業者には明らかであろう。従って、添付された請求の範囲及びその均等の範囲に入る限り、この発明の変更はこの発明に属することが意図される。

FIG. 1.

キリントモナス・カンベストリスにおける糖ヌクレオチドの合成経路は UDP-グルコース、UDP-グルクロン酸及び GDP-マンノースはキリントモナスの遺伝子であり、UDP-グルコース、UDP-グルクロン酸及び GDP-マンノースはポリサッカライドの断片であり、そして UDP-N-アセチルグルコサミンは細胞壁ペプチドグリカンの断片である。

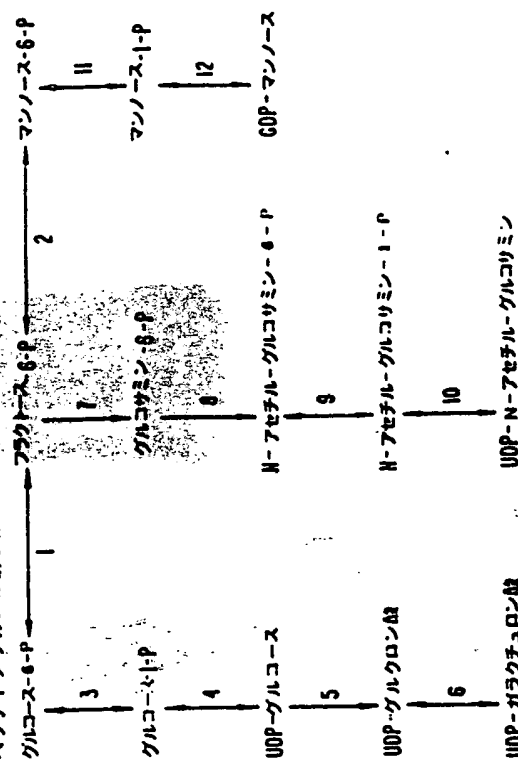
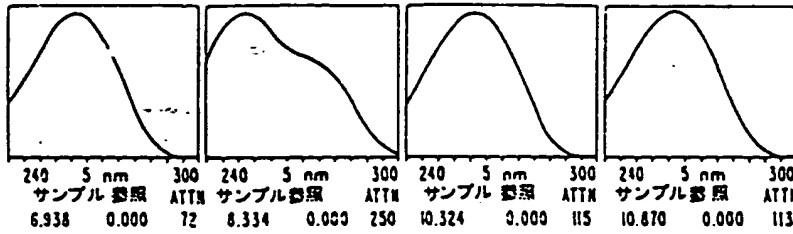


図 1:

1. グルコースホスフェート・イソメラーゼ
2. マンノースホスフェート・イソメラーゼ
3. ホスホグルコムターゼ
4. UDP-グルコース・ピロホスホリラーゼ
5. UDP-グルコース・デヒドロゲナーゼ
6. UDP-グルクロン酸・エピメラーゼ
7. グルコサミンホスフェート・イソメラーゼ
8. グルコサミンホスフェート・アセチルランスフェラーゼ
9. アセチルグルコサミンホスホムターゼ
10. UDP-グルコサミン・ピロホスホリラーゼ
11. ホスホマンノース・ムターゼ
12. GDP-マンノース・ピロホスホリラーゼ

FILE: STOSMAR5'S
DATE: 03/05/1985

hp 1040A

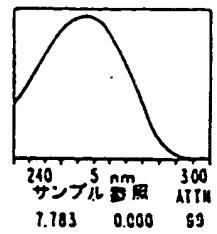


UOP-グルコース

GOP-マンノース

UOP-ガラクトチュロン酸

UOP-グルクロン酸



UOP-N-アセチルグルコサミン

注入時 14:26
ATTN (mAU): 100.0 (205.8)
0 %: 10 %
シグナル: A: 4,8 セット M

波 長
1 210 4
2 225 4
3 254 4
4 260 4
5 280 4
6 320 20
7 450 50
8 550 50

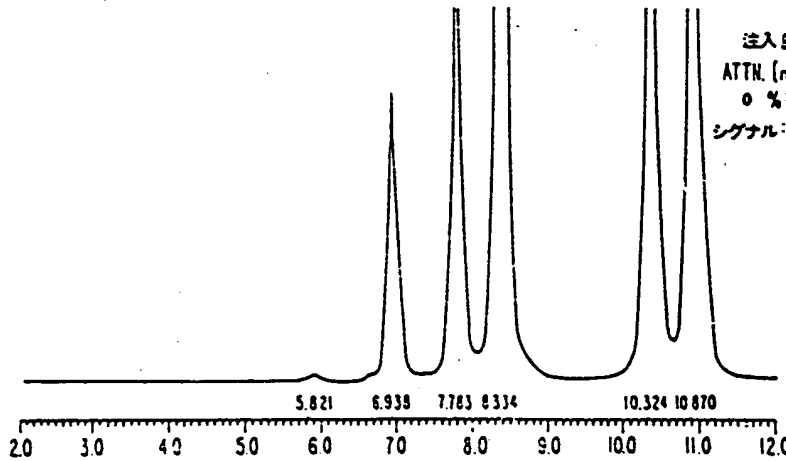
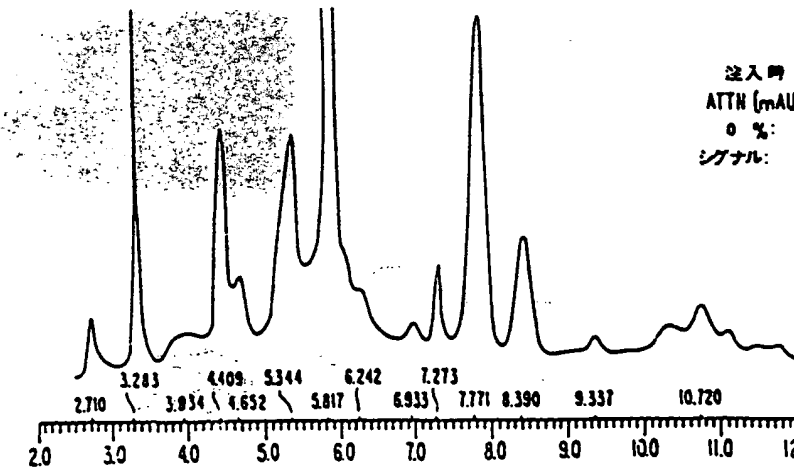
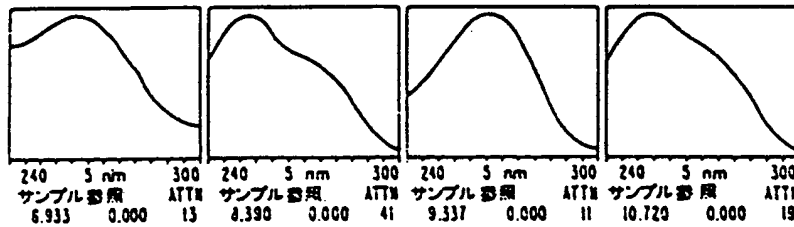


FIG. 2.

明細書に記載したこと
きHPLC による糖ア
クレオチド標準の分離

FILE: X872MAR5'S
DATE: 03/05/1985

hp 1040A



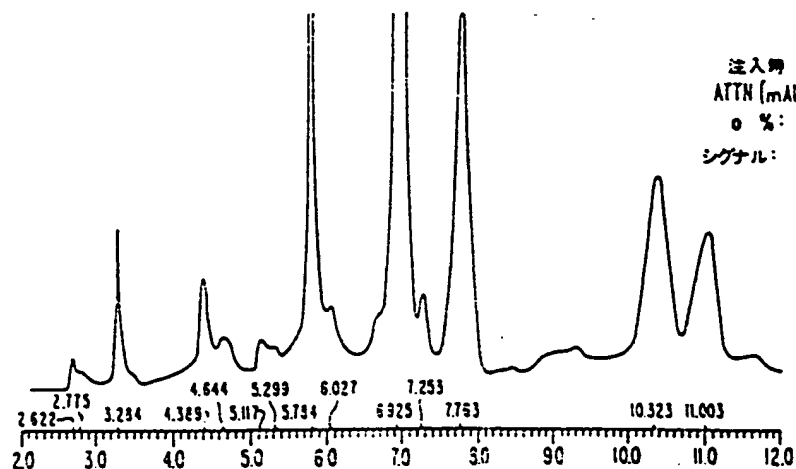
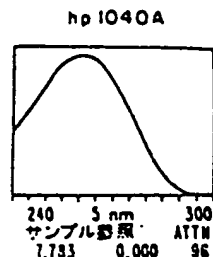
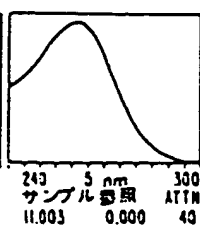
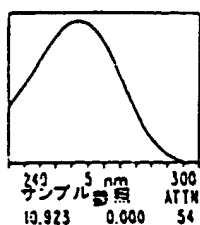
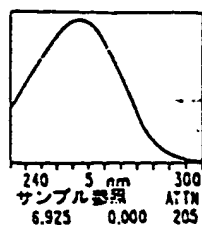
注入時 16:38
ATTN (mAU): 100.0 (183.1)
0 %: 10 %
シグナル: A: 4,8 セット

波 長
1 210 4
2 225 4
3 254 4
4 260 4
5 280 4
6 320 20
7 450 50
8 550 50

FIG. 3.

X. カンペストリス X 872
から、UOP-グルコース、UOP
-ガラクトチュロン酸及びUOP
-グルクロン酸の不在

FILE: X869MARS'S
DATE: 03/05/1985



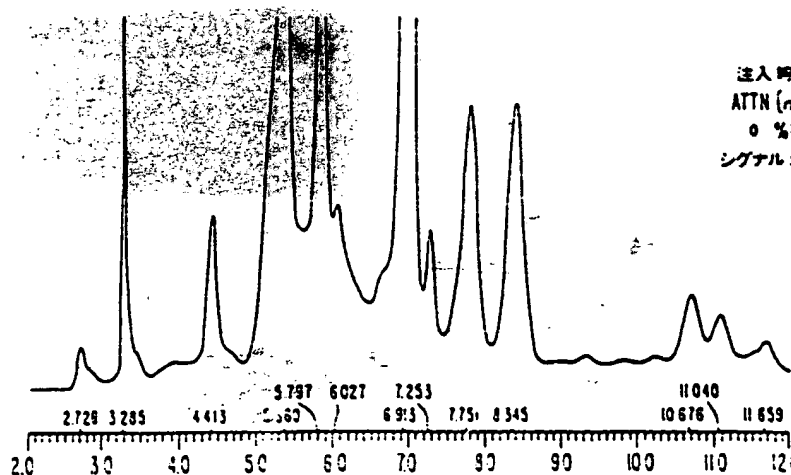
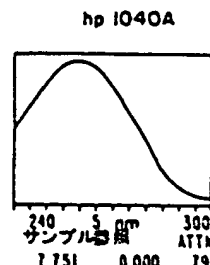
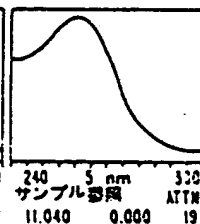
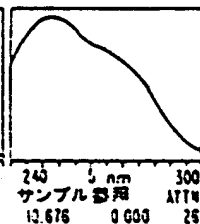
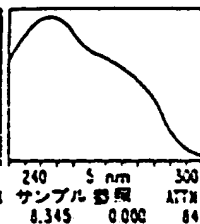
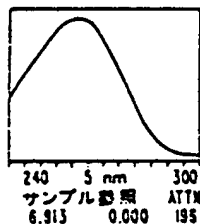
注入時 13:21
ATTN (mAU): 100.0 (194.4)
o %: 10%
シグナル: A: 4,8 セット

波 長	
1. 210	4
2. 225	4
3. 254	4
4. 260	4
5. 280	4
6. 320	20
7. 450	50
8. 550	50

FIG. 4.

X. カンベストリス X 869
から、GOP-マンノースの
不揮発

FILE: X871MARS'S
DATE: 03/05/1985

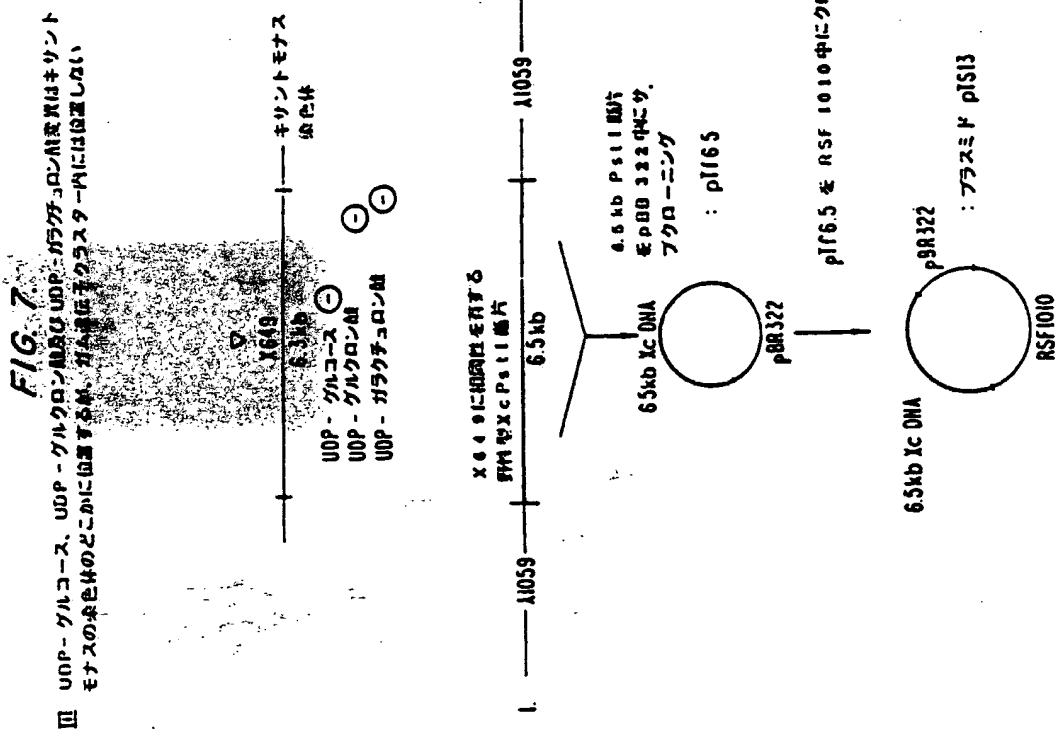
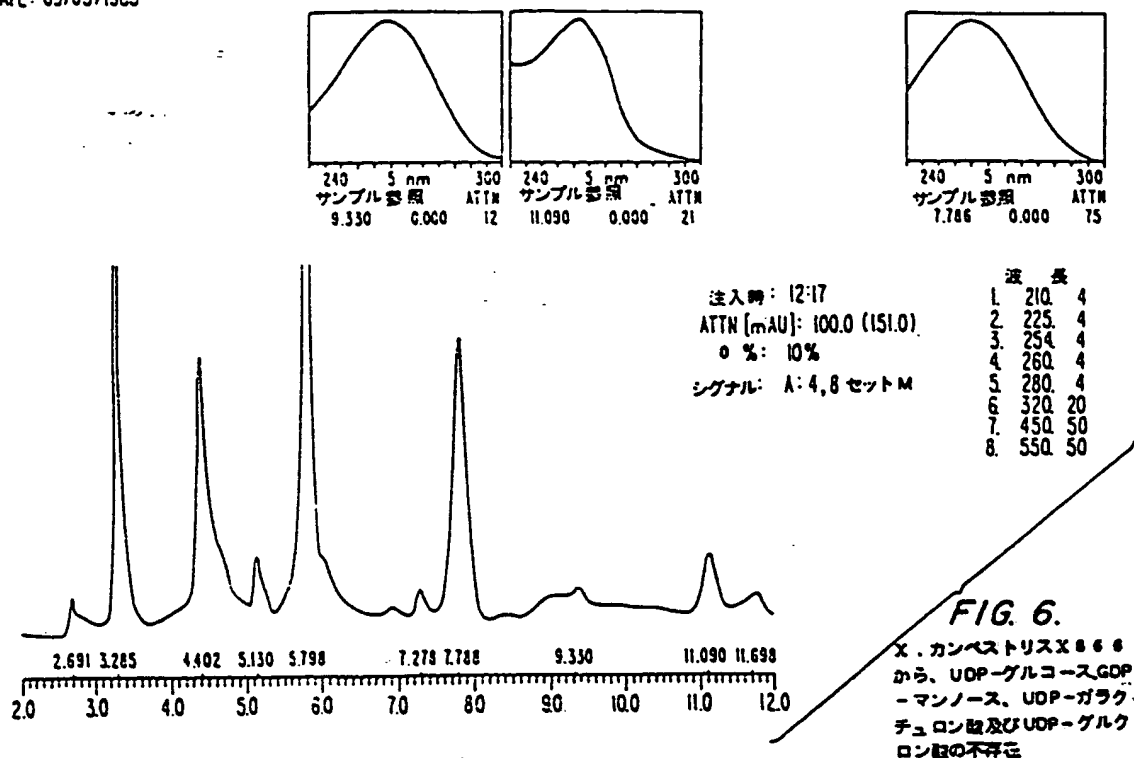


注入時: 15:34
ATTN (mAU): 1000 (185.2)
o %: 10%
シグナル: A: 4,8 セットM

波 長	
1. 210	4
2. 225	4
3. 254	4
4. 260	4
5. 280	4
6. 320	20
7. 450	50
8. 550	50

FIG. 5.

X. カンベストリス X 871
から、UDP-ガラクトース
酸及びUDP-グルクロン酸の
不揮発

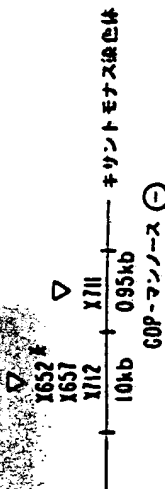


II. UDP-グルクロン型及びUDP-ガラクトキロン型変異はキサントモナス染色体のどこかに位置するが、ガム遺伝子クラスター内には位置しない



1910-1911年間の調査結果

1. GOR-マンノース欠損症はキヤントモスアの色体上に残っているが、ガム通子を含むGOMの領域には残っていない。



※ 実質はX652はさらにUOP-グルコース及び関連化合物にも欠損している

A 野性型キサントモナス染色体の大断片を1-1059中にパッケージジ

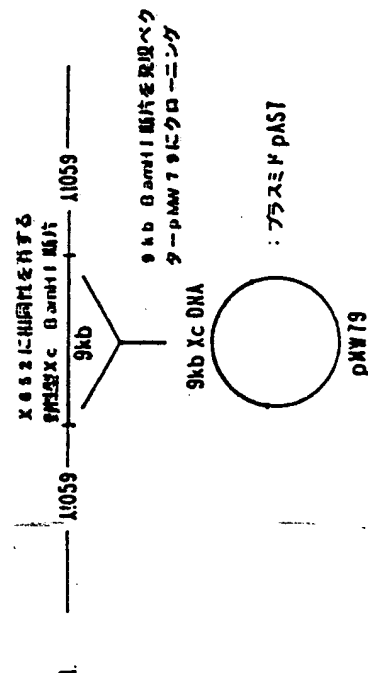


FIG. 10

0.25mM KNO₃と共にインキュベートされた
パラコッカス・デニトリフィカンスからの抽出物
のクロマトグラム

FILE: 17741N0606
DATE: 06/07/1984
注入時: 05:00
ATTN (mAU): 25.0 (28.6)
0 %: 10
シグナル: A: 4,8

波 長 (nm)
1. 210. 4
2. 225. 4
3. 254. 4
4. 260. 4
5. 280. 4
6. 320. 20
7. 450. 50
8. 550. 100

hp 1040A

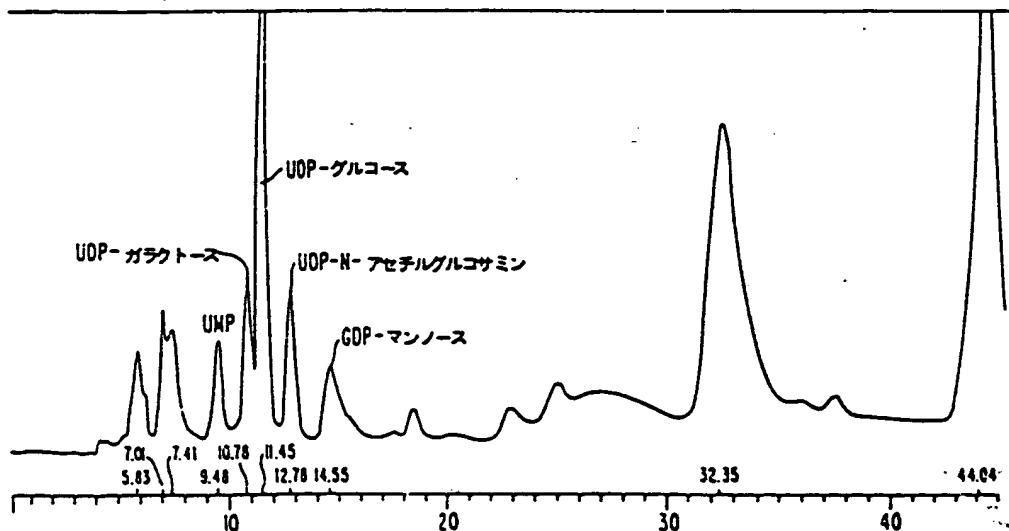


FIG. 11

パラコッカス・デニトリフィカンスからの抽出物に見出される化合物のスペクトル。この図中
のすべてのヌクレオチド成分はワリジン化合物の特徴的なスペクトルを有する。

FILE:	17741N0606	17741N0606	17741N0606	17741N0606
DATE:	06/07/1984	06/07/1984	06/07/1984	06/07/1984
スペクトル [min]:	9.4762	10.7582	11.4488	12.7795
波 長 [min]:	なし	なし	なし	なし
ATTN (mAU):	11.5	11.7	33.5	91
吸収 [mAU]([nm]):	9.9 (219/2)	10.0 (219/2)	28.7 (261/2)	7.8 (261/2)

hp 1040A

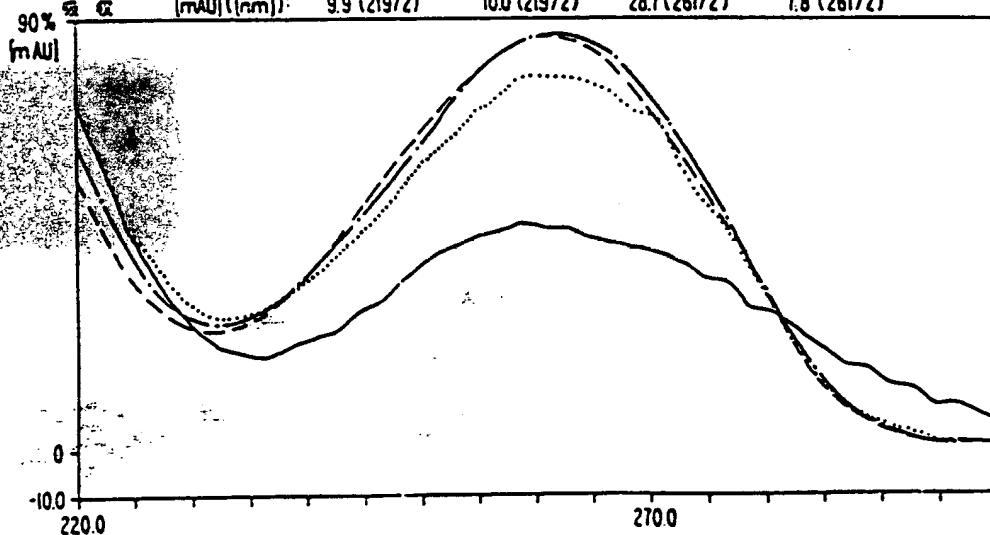
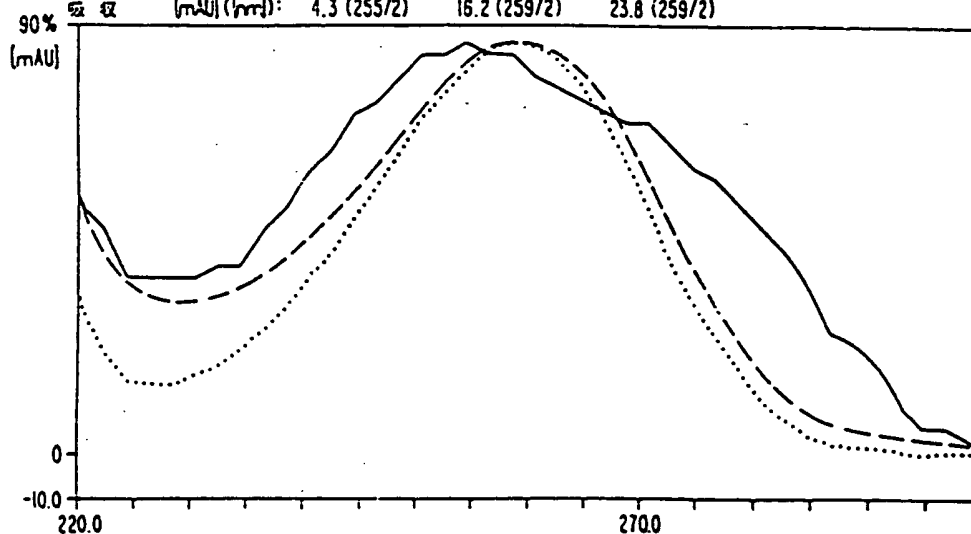


FIG. 12

hp1040A



三 讀 與 愛 國 學

[illegible]

75-1-33700-33

ALL INFORMATION CONTAINED HEREIN IS UNCLASSIFIED DATE 08-01-2001 BY 60322 UCBAW/SJS

1-17

JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY.
(Bethesda, MD, USA). Vol. 250 152.
issued 10 February 1979.
(CAREER E. ALI). Cloning of
genes for bacterial glycosyl-
transferases: I. Selection of
hybrid plasmids carrying genes for
the glucosyltransferases. See
pages 33-312.

④Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

/(C 12 P 19/30
C 12 R 1:145)
(C 12 P 19/30
C 12 R 1:40)
(C 12 P 19/30
C 12 R 1:19)
(C 12 P 19/30
C 12 R 1:01)
(C 12 N 1/20
C 12 R 1:19)
(C 12 N 1/20
C 12 R 1:64)
(C 12 N 15/00
C 12 R 1:64)

優先権主張

④1987年3月23日④米国(U S)④029,091

④発明者

バンダースライス、レベツカ、
ダブリユ。

アメリカ合衆国，コロラド 80303，ボウルダー，タントラ パ
ク サークル 1011